



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12P 1/04, C07G 17/00, A61K 35/74, 39/04, 38/46 // (C12P 1/04, C12R 1:32)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/20673
			(43) Date de publication internationale: 3 août 1995 (03.08.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00092		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 26 janvier 1995 (26.01.95)		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: 94/01170 28 janvier 1994 (28.01.94) FR			
(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BONNEVILLE, Marc [FR/FR]; 15, rue de l'Oliveraie, F-44200 Nantes (FR). CONSTANT, Patricia, Marie-Claude [FR/FR]; 20, rue de Castanet, F-31400 Toulouse (FR). FOURNIE, Jean-Jacques [FR/FR]; Rue Jeanne-Dieulafoy, F-31450 Pompertuzat (FR). PUZO, Germain [FR/FR]; 2, impasse Goudouli, Auzeville-Tolosane, F-31320 Castanet (FR).			
(74) Mandataire: BARRE, Philippe; Cabinet Barre Laforgue & Associés, 95, rue des Amidonniers, F-31000 Toulouse (FR).			
(54) Title: ORGANO-PHOSPHORUS COMPOUNDS AS ACTIVATORS OF GAMMA DELTA T CELLS			
(54) Titre: COMPOSES ORGANO-PHOSPHORES ACTIVATEURS DES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA			
(57) Abstract			
<p>Non-peptide hydrosoluble organo-phosphorus containing compound for use as a human T_{γδ} cell activator, comprising at least one acidolabile ester bond of phosphoric acid. The activating properties of said compound in relation to lymphocytes are lost when it is placed in the presence of an enzymatic mixture comprising at least one phosphoric phosphohydrolase monoester and at least one phosphoric phosphohydrolase diester. The invention also concerns a method for the preparation, isolation or characterization of such a compound and compositions and pharmaceutical uses thereof.</p>			
(57) Abrégé			
<p>L'invention concerne un composé organo-phosphoré hydrosoluble de nature non-peptidique, activateur des lymphocytes T_{γδ} humains, comprenant au moins une liaison ester acidolabile de l'acide phosphorique, le caractère activateur de ce composé vis-à-vis des lymphocytes disparaissant lorsqu'il est placé en présence d'un mélange enzymatique comprenant au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase et au moins une diester phosphorique phosphohydrolase. L'invention concerne aussi un procédé pour préparer et/ou isoler et/ou caractériser un tel composé et des compositions et utilisations pharmaceutiques.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

COMPOSES ORGANO-PHOSPHORES ACTIVATEURS DES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA

5 L'invention concerne des composés organo-phosphorés hydrosolubles non-peptidiques stimulant des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains. L'invention concerne aussi un procédé pour préparer et/ou isoler et/ou caractériser de tels composés organo-phosphorés, une composition 10 pharmaceutique, notamment vaccinante comportant au moins un tel composé organo-phosphoré, diverses utilisations de ces composés pour obtenir des compositions pharmaceutiques, une composition pharmaceutique inhibant l'activité de ces composés sur les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ et les utilisations de 15 cette composition pour obtenir des médicaments.

On sait déjà que les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables V_{γ} et V_{δ} (lymphocytes CD3+, TCR $\alpha\beta-$, CD4-, CD8-) jouent un rôle dans le système immunitaire de l'homme et de l'animal. 20 Par exemple, leur présence a été démontrée dans le cadre de diverses maladies telles que les infections bactériennes, notamment mycobactériennes (en particulier la tuberculose et la lèpre) ou à streptocoques, les affections tumorales ou leucémiques, certains parasites (par exemple le 25 *Plasmodium*), le SIDA et les maladies auto-immunes (sclérose en plaques, lupus, ...).

On sait aussi que dans le sang périphérique de l'adulte, les lymphocytes T porteurs de TCR à régions variables $V_{\gamma}9$ $V_{\delta}2$ (lymphocytes $T_{\gamma}9\delta2$) représentent la 30 majorité (de l'ordre de 80 %) des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$.

On cherche ainsi depuis la découverte des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ à comprendre le mécanisme de leur activation et leurs fonctions physiologiques.

Certains auteurs ont pensé que les 35 lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ répondent à un antigène formé d'une protéine telle que HSP60. D'autres auteurs ont cependant contredit cette thèse. Néanmoins, il n'a pas encore été possible d'isoler un antigène des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$.

Il a été aussi démontré que les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ reconnaissent et lysent les cellules cancéreuses et les cellules infectées, notamment par les mycobactéries, et s'accumulent sur certains sites infectieux.

5 Or, les affections sus-mentionnées dans lesquelles les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ interviennent sont pour la plupart considérées à ce jour comme particulièrement sévères. En conséquence, depuis la découverte des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$, on cherche à mettre en évidence le (les) 10 antigène(s) susceptible(s) de les activer et à expliquer la raison de leur présence en grand nombre dans le sang périphérique de l'adulte.

Par ailleurs, dans certains cas, les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ agissent comme des agents pathogènes qu'il 15 serait souhaitable de pouvoir inhiber. Tel est le cas en particulier dans le cadre des maladies auto-immunes, telles que la sclérose en plaques.

20 L'invention vise donc, de façon générale, à proposer des moyens pour contrôler la prolifération et/ou l'activité cytotoxique des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$, notamment des lymphocytes $T_{\gamma\delta 2}$ humains, que ce soit pour les stimuler en vue de favoriser leur rôle immunitaire, ou pour les inhiber lorsqu'ils sont impliqués dans une pathologie, notamment auto-immune.

25 Ainsi, l'invention vise à proposer des composés isolés activateurs des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$, notamment des lymphocytes $T_{\gamma\delta 2}$, leur procédé de préparation, leur utilisation dans une composition pharmaceutique, notamment vaccinante, et leurs diverses utilisations thérapeutiques 30 pour le traitement préventif ou curatif de l'homme ou de l'animal.

35 L'invention vise en particulier à proposer un procédé et une composition pour stimuler la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$. Et l'invention vise à proposer une utilisation de ce procédé ou de cette composition dans le traitement préventif (vaccin) ou curatif (immunomodulateur) : des maladies infectieuses à germes procaryotes ou eucaryotes -notamment

mycobactériennes, à streptocoques ou à plasmodium- ; et/ou des pathologies tumorales ou leucémiques ; et/ou des pathologies d'immunodéficiences telles que le SIDA.

5 L'invention vise également à proposer un procédé pour isoler et/ou caractériser des composés activant les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$, notamment des lymphocytes $T_{\gamma\delta 2}$ humains.

10 L'invention vise en outre à proposer une composition destinée à inactiver les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$, et plus particulièrement une composition thérapeutique inactivant la cytotoxicité des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ impliqués dans des pathologies auto-immunes telles que la sclérose en plaques.

15 Pour ce faire, l'invention concerne un composé organo-phosphoré hydrosoluble de nature non-peptidique, activateur des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables $V_{\gamma 9}$ et $V_{\delta 2}$, ce composé comprenant au moins une liaison ester acidolabile de l'acide phosphorique, le caractère 20 activateur de ce composé vis-à-vis des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ disparaissant lorsqu'il est placé en présence d'un mélange enzymatique comprenant au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase et au moins une diester phosphorique phosphohydrolase. Selon l'invention, le mélange enzymatique 25 peut comprendre une pyrophosphohydrolase à titre de diester phosphorique phosphohydrolase.

30 Un composé selon l'invention présente un caractère anionique mesuré par chromatographie HPAEC à détection conductimétrique en mode de suppression chimique qui est supérieur à celui de l'acide phosphonoformique et inférieur à celui de la thymidine 5' triphosphate. 35 Egalement, l'invention concerne un composé caractérisé en ce que, après traitement par une enzyme diester phosphorique phosphohydrolase, il présente un caractère anionique mesuré par chromatographie HPAEC à détection conductimétrique en mode de suppression chimique qui est supérieur à celui de l'acide phosphonoformique et inférieur à celui de la thymidine 5' triphosphate. En effet,

l'invention comprend les composés phosphodiester X-Phosphate-R dont la dégradation par l'enzyme diesterase libère le principe actif minimum X-Phosphate.

Egalement, l'invention concerne un composé 5 qui présente un caractère hydrophobe mesuré par chromatographie HPLC sur phase inverse de type C18 éluée en paire d'ions avec l'acétate d'ammonium qui est inférieur à celui de la thymidine 5' monophosphate. Plus particulièrement, un composé selon l'invention est 10 caractérisé en ce que son activation sur les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ est inhibée en présence d'anticorps monoclonaux spécifiques des TCR humains comprenant les régions variables $V_{\gamma 9}$ ou $V_{\delta 2}$.

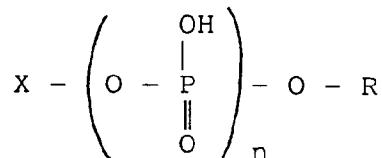
Un composé selon l'invention comprend au 15 moins un substituant X de masse moléculaire inférieure à 500, qui est distinct d'un acide nucléique, d'un oligosaccharide, d'un acide gras (c'est-à-dire un acide carboxylique saturé comprenant au moins quatre carbones), d'un protide, d'un alcaloïde et d'un stéroïde, et qui est 20 lié dans le composé à un groupement phosphoryle par une liaison covalente acidolabile susceptible d'être clivée en présence d'une monoester phosphatase. En effet, il apparaît que la présence de la séquence X-Phosphate suffit pour conférer un pouvoir antigénique au composé selon 25 l'invention à l'égard des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$.

Par ailleurs, au moins un des composés organo-phosphorés selon l'invention comporte au moins un groupement nucléotidique. En particulier, l'invention concerne un composé répondant à la formule X-Phosphate-R où 30 R est un hydrogène ou un substituant minéral ou organique, notamment un groupement nucléosidique, et X est un substituant tel que mentionné ci-dessus.

En particulier, l'invention concerne un composé répondant à la formule :

35

40



où :

R est un hydrogène ou un substituant minéral ou organique, n est un nombre entier non nul.

L'invention concerne aussi un composé 5 constitué d'un produit d'hydrolyse obtenu à partir d'un composé selon l'invention qui comprend la thymidine liée à un groupement phosphoryle par le cinquième carbone de son radical 2-désoxyribose, cette hydrolyse pouvant notamment être obtenue par l'action enzymatique d'une nucléotide 10 pyrophosphatase et/ou d'une diester phosphorique phosphohydrolase.

Egalement, l'invention concerne un composé constitué d'un monoester phosphorique acidolabile de masse moléculaire inférieure à 500 distinct de la thymidine 5' 15 monophosphate, de la thymidine 5' diphosphate, de la thymidine 5' diphosphate glucose et de la thymidine 5' triphosphate.

Egalement, l'invention concerne un composé constitué d'un diester phosphorique acidolabile de masse 20 moléculaire inférieure à 1 000, distinct de la thymidine 5' monophosphate, de la thymidine 5' diphosphate, de la thymidine 5' diphosphate glucose et de la thymidine 5' triphosphate.

Un composé selon l'invention constitue un 25 antigène isolé des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains, notamment des lymphocytes T à récepteurs TCR comprenant les régions variables $V_{\gamma 9}$ et $V_{\delta 2}$, et peut être utilisé en tant que tel.

Il est à noter que contrairement au préjugé général de l'art antérieur, et de façon surprenante, un 30 antigène selon l'invention n'est pas peptidique. Il n'est pas non plus constitué d'une protéine telle que hsp60 ou hsp65, ni d'un peptide en dérivant. C'est pourquoi, les procédés traditionnels mis en oeuvre dans l'art antérieur pour isoler ces antigènes à partir d'une solution 35 antigénique, et qui supposent que les antigènes sont de nature protéique, ont échoué.

L'invention concerne aussi une composition pharmaceutique, et plus particulièrement une composition

vaccinante comprenant au moins un composé organo-phosphoré selon l'invention.

Et l'invention concerne l'utilisation d'au moins un composé organo-phosphoré selon l'invention pour le 5 traitement préventif ou curatif des maladies infectieuses bactériennes, notamment mycobactériennes comme la lèpre ou la tuberculose, et/ou des affections tumorales ou leucémiques et/ou des parasitoses et/ou des maladies d'immunodéficiences telles que le SIDA et/ou des maladies 10 parasitaires, notamment du paludisme, de l'homme ou de l'animal. L'invention concerne ainsi l'utilisation d'au moins un composé organo-phosphoré selon l'invention pour obtenir une composition pharmaceutique destinée au traitement préventif ou curatif de ces maladies, notamment 15 par voie générale. Plus particulièrement, la composition pharmaceutique est formulée sous une forme galénique permettant son administration par voie intravasculaire ou intramusculaire, c'est-à-dire directement dans le sang au contact des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ qui doivent être activés.

20 L'invention concerne aussi un procédé pour caractériser un antigène des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains, notamment un composé selon l'invention, caractérisé en ce que :

- l'on vérifie qu'il induit une activation 25 des lymphocytes,
- l'on vérifie que cette propriété vis-à-vis des lymphocytes disparaît lorsqu'il est placé en présence d'un mélange enzymatique comprenant au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase et au moins une 30 diester phosphorique phosphohydrolase.

L'invention concerne aussi un procédé pour préparer et/ou isoler et/ou caractériser au moins un composé selon l'invention, caractérisé en ce qu'on soumet une solution aqueuse activant les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à 35 au moins une étape de séparation par chromatographie préparative en différentes fractions, et en ce que l'on teste l'activité de chaque fraction sur des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains. Le procédé selon l'invention pour isoler au moins

un composé selon l'invention est caractérisé par les étapes suivantes :

5 - on cultive une souche d'êtres vivants unicellulaires susceptible d'activer les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables $V_{\gamma 9} V_{\delta 2}$,

10 - on réalise un extrait brut de la souche ou on collecte son milieu de culture, et on sépare les composants hydrosolubles de cet extrait ou milieu,

15 - on sépare une solution aqueuse comprenant ces composants hydrosolubles par chromatographie préparative en différentes fractions susceptibles d'activer des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables $V_{\gamma 9} V_{\delta 2}$.

20 Selon l'invention, on cultive une souche de bactéries, notamment de mycobactéries, on effectue une extraction lipidique, et on sépare la phase aqueuse de l'extrait lipidique brut. En particulier, on cultive *Mycobacterium tuberculosis* souche H37Rv ou H37Ra.

25 En variante, avantageusement et selon l'invention, on cultive une souche de mycobactéries dont la croissance est rapide. Plus particulièrement, on cultive *Mycobacterium fortuitum* biovar *fortuitum* apte à sécréter le (les) composé(s) dans le milieu de culture.

30 Selon l'invention, l'étape de séparation par chromatographie comprend une séparation anionique par chromatographie échangeuse d'anions avec une solution saline dont on récupère l'éluat salin qui active les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$. Avantageusement, on prévoit une séparation de la solution saline qui active les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$, suivie d'un séchage.

35 Selon l'invention, l'étape de séparation par chromatographie comprend au moins une séparation préparative des différents principes actifs de l'éluat par chromatographie HPLC sur phase inverse C18 éluée en paire d'ions et/ou par chromatographie échangeuse d'anions HPAEC avec détection conductimétrique opérant en mode du suppression chimique, chaque étape de séparation étant

suivie d'une mesure de l'activité des différentes fractions obtenues sur les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$.

Pour caractériser un composé organo-phosphoré selon l'invention, on soumet une solution aqueuse de ce composé à un traitement enzymatique en l'incorporant dans un mélange comprenant au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase et/ou au moins une diester phosphorique phosphohydrolase, et on mesure l'activité de ce mélange sur des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$. Si la solution aqueuse de départ comprend un composé selon l'invention, on constate une disparition de son activité sur les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$. En outre, selon l'invention, on soumet la solution aqueuse de départ à au moins une analyse chromatographique de ses différents principes actifs par chromatographie HPLC sur phase inverse C18 éluée en paire d'ions et/ou par chromatographie échangeuse d'anions HPAEC avec détection conductimétrique opérant en mode de suppression chimique, chaque étape de séparation étant suivie d'une mesure de l'activité des différentes fractions obtenues sur les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$.

L'invention concerne aussi les composés organo-phosphorés qui peuvent être isolés et/ou caractérisés selon le procédé selon l'invention.

Par ailleurs, l'invention concerne aussi une composition thérapeutique destinée à inhiber la prolifération et/ou la cytotoxicité des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ caractérisée en ce qu'elle contient une proportion pharmaceutiquement acceptable d'au moins un principe présentant une activité enzymatique phosphatase qui est susceptible de cliver au moins un composé activant des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables $V_{\gamma 9}$ et $V_{\delta 2}$. Selon l'invention, la composition comporte une monoester phosphorique phosphohydrolase. En variante ou en combinaison, avantageusement et selon l'invention, la composition comporte au moins une nucléotide pyrophosphatase et/ou au moins une diester phosphorique phosphohydrolase. Selon l'invention, la composition comporte au moins une enzyme

phosphatase alcaline.

Selon l'invention, cette composition est formulée sous une forme galénique permettant son administration directement au contact du milieu incorporant 5 les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ auto-immunes pathogènes ou au contact d'un milieu susceptible de transporter la composition au contact des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ auto-immunes pathogènes.

Ainsi, la composition selon l'invention est avantageusement formulée sous une forme galénique 10 permettant son administration par injection dans le sang circulant par exemple, par voie intravasculaire, notamment intraveineuse, ou intramusculaire, ou intradermique, ou autre.

L'invention concerne aussi l'utilisation 15 d'une composition selon l'invention pour obtenir un médicament inhibant la cytotoxicité des lymphocytes $T_{\gamma\delta 2}$ impliqués dans au moins une pathologie auto-immune, notamment de la sclérose en plaques. En effet, les lymphocytes $T_{\gamma\delta 2}$ sont impliqués dans les dégradations 20 neurologiques de la sclérose en plaques, et la composition selon l'invention vise à inhiber l'activité cytotoxique *in situ* des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$, c'est-à-dire, leur activité destructrice des cellules du système nerveux central.

D'autres caractéristiques et avantages de 25 l'invention apparaîtront de la description suivante des exemples et essais, qui se réfère aux figures annexées dans lesquelles :

- la figure 1 est un chromatogramme par perméation de gel d'un extrait mycobactérien incorporant 30 les composés organo-phosphorés selon l'invention, avec indication des masses moléculaires estimées,

- la figure 2 est un chromatogramme HPLC C18 en paire d'ions obtenu par une étape de séparation chromatographique d'un procédé de préparation des composés 35 organo-phosphorés selon l'invention,

- la figure 3 est un graphe à points illustrant l'amplification des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ en culture avec un composé organo-phosphoré selon l'invention,

- les figures 4a et 4b illustrent le profil cytofluorimétrique bidimensionnel des lymphocytes $T_{\gamma}962$ en culture respectivement sans et avec un composé organo-phosphoré selon l'invention,

5 - la figure 5 est une courbe de titration de l'effet lymphoprolifératif d'un composé organo-phosphoré selon l'invention, pour un clone de lymphocytes $T_{\gamma}962$.

10 - la figure 6 est un spectre de résonance magnétique nucléaire 1H d'un composé organo-phosphoré selon l'invention,

- la figure 7 est un spectre de masse d'un composé organo-phosphoré selon l'invention,

15 - la figure 8 illustre trois chromatogrammes superposés HPLC C18 en paire d'ions respectivement de molécules phosphorylées témoins inactives ; d'un composé organo-phosphoré selon l'invention traité par une monoester phosphohydrolase alcaline ; et une nucléotide pyrophosphatase,

20 - la figure 9 est un histogramme illustrant la cytotoxicité induite par un composé organo-phosphoré selon l'invention, sur les lymphocytes $T_{\gamma}6$ en présence d'anticorps monoclonaux de différentes spécificités.

PREPARATION DES COMPOSES ORGANO-PHOSPHORES ISOLES :

25 Pour préparer les composés organo-phosphorés isolés selon l'invention, on part d'une culture d'une souche d'êtres vivants unicellulaires susceptible d'activer des lymphocytes $T_{\gamma}6$ humains. Plus particulièrement, on part d'une culture de *Mycobacterium* 30 *tuberculosis* (Institut Pasteur, PARIS - FRANCE) qui active les lymphocytes $T_{\gamma}962$. On réalise ensuite un extrait brut de la souche dont on sépare la phase aqueuse. Pour ce faire, on recueille le voile mycobactérien de la culture que l'on traite au chloroforme/méthanol de façon répétée 35 afin de tuer les bactéries et d'en extraire les substances lipidiques. On réalise une partition des phases aqueuse et organique obtenues.

En variante, on peut aussi partir d'une

culture de souche d'une autre mycobactéries. En particulier, il est avantageux d'utiliser une mycobactéries à croissance rapide et sécrétant les composés recherchés dans le milieu de culture. Par exemple, on peut utiliser *Mycobacterium fortuitum* biovar *fortuitum*. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de réaliser un extrait brut, et il suffit de collecter le milieu culture dont on sépare les composés hydrosolubles.

La phase aqueuse ainsi obtenue, dénommée ci-après "extrait ME", contient les composés que l'on sépare par chromatographie préparative en fractions susceptibles d'activer les lymphocytes $T_{\gamma}962$.

On détermine l'activité des fractions chromatographiques en examinant la prolifération induite d'un clone de lymphocytes $T_{\gamma}962$ humains actifs sur les mycobactéries de départ (par exemple le clone G115) par la méthode décrite par F. DAVODEAU et al., Journal of Immunology Vol. 151, P 1214 (1993) (test de lymphoprolifération).

Les composés sont purifiés de l'extrait ME par une séparation chromatographique échangeuse d'anions, suivie d'une séparation chromatographique de la solution saline par une colonne d'acide silicique, et d'une séparation chromatographique HPLC sur phase inverse C18 en paires d'ions et/ou d'une séparation chromatographique échangeuse d'anions HPAEC.

Plus précisément, les solutions de l'extrait ME sont passées dans une colonne échangeuse d'anions de type diéthylaminoéthyl (DEAE) dans laquelle les principes actifs sont élusés par des concentrations croissantes de l'acétate d'ammonium. L'activité stimulatrice de chaque élutat est testée sur le clone G115 par le test de lymphoprolifération. Les élutants actifs sur le clone G115 sont traités ensuite dans une colonne chromatographique d'acide silicique pour les séparer de la solution saline d'acétate d'ammonium. Les élutants successifs utilisés sont l'éthanol 100 %, l'éthanol 90 %, le propanol 2 100 % et le propanol H₂O (70 % - 30 %). Les

éluats sont séchés et soumis au test de lymphoprolifération. On constate que le dernier éluat est actif, et contient les composés selon l'invention.

Les différents principes actifs de l'éluat 5 ainsi obtenu sont ensuite soumis à une séparation chromatographique sur une colonne C18 de séparation de la phase hydrophile. Les produits élués en phase aqueuse sont ensuite soumis à une séparation chromatographique HPLC sur une colonne préparative 250/40 C18 telle que BISCHOFF 10 (marque déposée) ULTRASEP 10 μ m éluée en paire d'ions avec 15 l'acétate d'ammonium 0,1 M. L'absorption aux différentes longueurs d'ondes est contrôlée par un détecteur d'absorption dans l'ultraviolet. On collecte des fractions chromatographiques toutes les 30 secondes pendant une durée totale de 40 min.

Le chromatogramme à 260 nm est donné par la courbe en pointillés de la figure 2. La courbe en points blancs illustre l'activité des différentes fractions chromatographiques mesurée par le test de 20 lymphoprolifération. Cette activité est exprimée en Kcpm (milliers de coups par minute) de la thymidine tritiée incorporée par le clone G115. Par cette séparation chromatographique, on constate la présence de quatre fractions comportant respectivement quatre composés selon 25 l'invention désignés TUBag1, TUBag2, TUBag3 et TUBag4 dans leur ordre d'élution croissant. Comme on le voit, figure 2, chaque fraction active est de composition hétérogène. Chaque fraction active est individuellement chromatographiée à nouveau par une séparation 30 chromatographique HPLC conforme à la dernière étape sus-décrise.

Chaque fraction est ensuite soumise à une séparation chromatographique échangeuse d'anions HPAE éluée par un gradient de soude 0,1 M et de méthanol dans l'eau. 35 Par ailleurs, cette chromatographie permet de mesurer le caractère anionique des différents composés selon l'invention révélé par un détecteur conductimétrique opérant en mode de suppression chimique. Cette séparation

chromatographique permet aussi de contrôler l'homogénéité des composés ainsi purifiés.

Le tableau I fournit les temps de rétention des quatre composés purifiés et de diverses biomolécules 5 étalons par HPAEC.

TABLEAU I

TEMPS DE RETENTION (RT)
(exprimés en minutes +/- 0,05 min.)

10	COMPOSE	RT	COMPOSE	RT	COMPOSE	RT
	TUBag1	7,67	Glucose 1P	1,46	TMP5'	7,67
	TUBag2	7,67	Séroline P	6,26	TDP5'Glc	7,67
	TUBag3	14,0	PF	7,13	TDP5'	12,66
	TUBag4	13,0	PEP	7,97	TTP5'	17,27

15 Abréviations : P : phosphate, PF : acide phosphonoformique, PEP : acide phosphoénolpyruvique, TMP5' : thymidine 5' monophosphate, TDP5' : thymidine 5' diphosphate, TDP5' Glc : thymidine 5' diphosphoryl-1 glucose, TTP5' : thymidine 5' triphosphate.

20 Colonne utilisée : échangeuse d'anions sur support pelliculaire modèle AS11 Dionex (marque déposée) 250/4 mm, Eluant utilisé : 2 ml/min composé de la séquence suivante :
 - de 0 à 1 min : isocratique 90 % H₂O + 10 % NaOH (0,1 M),
 - de 1 à 12,5 min : gradient atteignant 50 % H₂O + 50 %
 25 NaOH (0,1 M) à 12,5 min,
 - de 12,5 à 22 min : gradient atteignant 5 % H₂O + 50 % NaOH (0,1 M) + 45 % Méthanol à 22 min,
 - de 22 à 23 min : gradient atteignant 90 % H₂O + 10 % NaOH (0,1 M) à 23 min,
 30 - de 23 à 28 min : isocratique 90 % H₂O + 10 % NaOH (0,1 M).

Détecteur utilisé : conductimètre précédé d'un suppresseur ionique à membrane DIONEX (marque déposée).

35 Comme on le voit, le caractère anionique de TUBag1 et TUBag2 est analogue à celui de la thymidine 5' monophosphaté (TMP). Egalement, le caractère anionique des antigènes isolés TUBag3 et TUBag4 est plus important que

celui de la thymidine 5' diphosphate, mais moins important que celui de la thymidine 5' triphosphate.

Le caractère anionique des composés antigéniques TUBag1, TUBag2, TUBag3 et TUBag4 est donc 5 supérieur à celui de l'acide phosphonoformique et inférieur à celui de la thymidine 5' triphosphate.

ANALYSE DE LA STIMULATION DES LYMPHOCYTES $T_{\gamma 962}$ PAR LE COMPOSE TUBag4 :

10 On a recueilli les lymphocytes du sang circulant de quatre donneurs humains sains. Ces lymphocytes sont cultivés en présence d'interleukine 2 pendant 10 jours, avec ou sans le composé TUBag4, en quantité saturante. En fin de culture, les nombres de lymphocytes 15 $T\alpha\beta$, $T\gamma\delta$ ou CD3- (non T) sont comparés dans chacune des deux cultures.

La figure 3 présente le rapport d'amplification, soit le rapport du nombre de cellules en culture avec TUBag4 sur le nombre de cellules en culture 20 sans TUBag4. Chaque point représente un donneur. Comme on le voit, TUBag4 induit en culture une amplification spécifique polyclonale des lymphocytes $T\gamma\delta$ d'un facteur compris entre 40 et 500 selon les individus.

Les figures 4a et b présentent le phénotype 25 du récepteur TCR des lymphocytes du sang circulant d'un donneur humain sain cultivés en l'absence (figure 4a) et en présence (figure 4b) de TUBag4. Comme on le voit, TUBag4 induit une amplification massive mais sélective des lymphocytes $T_{\gamma 962}$.

30 La figure 5 présente la titration de l'effet prolifératif de TUBag4 sur un clone de lymphocytes $T_{\gamma 962}$ (G115) mesuré par le test de lymphoprolifération. Comme on le voit (courbe à points noirs), on a constaté un effet prolifératif de TUBag4 à partir d'une concentration 35 de l'ordre de 1 ng/ml. La courbe en points blancs traduit l'effet prolifératif en l'absence de TUBag4.

Des résultats analogues obtenus avec TUBag1, TUBag2 et TUBag3 confirment le caractère

antigénique commun de ces composés pour les lymphocytes $T_{\gamma 6}$.

ANALYSE STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLES :

On a tout d'abord soumis la phase aqueuse 5 de l'extrait mycobactérien (ME) mentionnée ci-dessus à deux expériences. Dans la première expérience, le test de lymphoprolifération sur le clone G115 a été conduit sur l'extrait ME seul, sur l'extrait ME en présence de protéinase K (Merck, 6 mU/mp, 2 h à 37° C), et sur 10 l'extrait ME en présence de periodate (10mM de NaHIO4, 2 h à 37° C). Dans la seconde expérience, le test a été conduit sur l'extrait ME seul, puis sur l'extrait ME en présence d'enzyme monoester phosphorique phosphohydrolase notamment la phosphatase alcaline. Les lymphoproliférations 15 spécifiques obtenues sont exprimées dans le tableau II suivant, après soustraction de la prolifération spontanée (non stimulée) du clone G115 :

TABLEAU II

20		prolifération du clone G 115 (cpm)
	<u>Expérience 1</u>	
25	ME	12 000
	ME traité avec proteinase K	12 000
	ME traité avec periodate	2 000
	<u>Expérience 2</u>	
30	ME	15 000
	ME traité avec phosphatase alcaline	7 000

Ainsi, l'extrait antigénique ME active le clone G115 de lymphocytes $T_{\gamma 6}$. Cet extrait ME est résistant aux protéases, mais son activité sur le clone 35 G115 est inhibée en présence de périodate. L'extrait ME subit donc une dégradation par l'acide périodique. De plus, l'extrait ME est partiellement dégradé sous l'action enzymatique d'une phosphatase alcaline. En conséquence, les antigènes sont hydrosolubles, de nature non-peptidique, 40 mais sont acidolabiles et organo-phosphorés.

A partir de cet extrait ME, on réalise une

séparation chromatographique par filtration de taille avec une colonne permettant la résolution des masses moléculaires comprises entre 400 et 10000, et dans laquelle les principes actifs sont élués par une solution saline 5 d'acétate d'ammonium 0,1 M. Le contenu osidique des fractions recueillies est testé (figure 1, points blancs) par réaction colorimétrique avec l'anthrone sulfurique mesurée à une longueur d'onde de 630 nm. Par ailleurs, l'activité antigénique de chaque fraction obtenue est 10 testée sur le clone G115 (points noirs sur la figure 1) par le test de lymphoprolifération.

Il ressort de la figure 1 que les fractions actives sur les lymphocytes ont toutes un poids moléculaire inférieur à 1000, et qui peut être estimé de l'ordre de 15 500.

Par ailleurs, l'antigène TUBag4 isolé a été soumis à une analyse structurale par résonance magnétique nucléaire. Le spectre obtenu par l'analyse ^1H unidimensionnelle (figure 6) démontre la présence des 20 groupes 2-désoxyribose et de la thymine. De plus, des essais de résonance magnétique bidimensionnelle, homonucléaire ^1H ^1H et hétéronucléaire ^1H ^{13}C permettent d'identifier de façon claire la liaison du groupement thymine par son premier azote au carbone anomérique du 25 radical 2-désoxyribose. De surcroît, les résultats permettent de postuler la liaison du cinquième carbone du radical 2-désoxyribose à un groupement phosphoryle.

Par ailleurs, le spectre obtenu par spectrométrie de masse (figure 7) confirme la présence du 30 groupement phosphoryle dans le composé TUBag4. Sur cette figure, on note également la présence de pics pour des valeurs du rapport masse sur charge de 126 et de 155, qui confirment la présence de la thymidine.

Cependant, le test de lymphoprolifération 35 sur le clone G115 effectué avec la thymidine 5' monophosphate, la thymidine 5' diphosphate et la thymidine 5' triphosphate démontre l'inactivité de ces composants sur les lymphocytes. En conséquence, les composés antigéniques

selon l'invention, ne sont pas exclusivement constitués de ces thymidines 5' phosphatées.

Par ailleurs, les quatre composés actifs obtenus par séparation chromatographique ont été soumis à des effets de dégradation enzymatique par des phosphatases. Les enzymes utilisées ont été la monoester phosphorique phosphohydrolase alcaline MP (EC 3.1.3.1), la diester phosphorique phosphohydrolase DP (EC 3.1.4.1) de venin de crotale, et la nucléotide pyrophosphatase NPP (EC 3.6.1.9) de venin de crotale.

L'action de chacun des composés mis au contact respectivement avec chacune de ces enzymes sur le clone G115 est résumée dans le tableau III suivant dans lequel le signe + indique que le composé a conservé une activité alors que le signe - indique la disparition de toute activité à l'égard des lymphocytes.

TABLEAU III

20	Antigène	Sans traitement	Avec AP	Avec NPP	Avec AP+NPP	Avec DP	Avec AP+DP
	TUBag1	+	—	+	—	—	—
	TUBag2	+	—	+	—	—	—
	TUBag3	+	+	-	—	—	—
25	TUBag4	+	+	clivage (activité de TUBag1)	—	clivage (activité de TUBag1)	—

Comme on le voit, la monoester phosphorique phosphohydrolase (AP) inactive TUBag1 et TUBag2, mais n'inactive pas TUBag3 et TUBag4. En conséquence, TUBag1 et TUBag2 sont des monoesters phosphoriques.

Par contre, la nucléotide pyrophosphatase (NPP) n'inactive pas TUBag1 et TUBag2, mais inactive TUBag3 et clive TUBag4. En conséquence, la présence d'un noyau nucléotidique est confirmée dans TUBag3 et TUBag4.

L'association d'une monoester phosphorique phosphohydrolase et d'un nucléotide pyrophosphatase sur les antigènes inactive l'intégralité de ces antigènes. Les

mêmes résultats sont obtenus sur TUBag4 en remplaçant la nucléotide pyrophosphatase (NPP) par la diester phosphorique phosphohydrolase (DP) de venin de crotale.

Par ailleurs, l'activité des antigènes en 5 présence des enzymes a été analysée par chromatographie HPLC sur face inverse C18 en paire d'ions. Les résultats sont illustrés par la figure 8 sur laquelle la courbe supérieure en traits pointillés illustre le profil des thymidines TTP, TDP, TDPGlc et TMP. La courbe médiane 10 illustre les résultats de la séparation chromatographique de TUBag4 préalablement traité par la monoester phosphorique phosphohydrolase, et la courbe inférieure illustre l'activité de TUBag4 préalablement traité par la nucléotide pyrophosphatase.

15 Comme on le constate sur cette dernière courbe, le composé TUBag4 soumis à l'enzyme nucléotide pyrophosphatase fournit le composé TUBag1.

En conséquence, l'ensemble de ces expérimentations démontre que les composés selon 20 l'invention sont des esters phosphoriques structuralement apparentés.

Par ailleurs, TUBag3 et TUBag4 présentent un substituant qui est un groupement nucléosidique identifié dans TUBag4 comme la thymidine liée au groupement phosphoryle dans l'ester par le cinquième carbone de son radical 2-désoxyribose.

Egalement, TUBag1 est le produit de l'hydrolyse de TUBag4 par l'action enzymatique d'une nucléotide pyrophosphatase ou d'une diester phosphorique phosphohydrolase.

Ainsi, TUBag1 est un monoester phosphorique qui est le produit actif de l'hydrolyse spontanée ou enzymatique de TUBag4 ; TUBag2 est un monoester phosphorique de caractère anionique analogue à celui de 35 TUBag1 mais de caractère hydrophobe supérieur ; TUBag3 est un diester pyrophosphorique nucléotidique ; et TUBag4 est un diester diphosphorique ou triphosphorique de la 5' thymidine incorporant TUBag1.

Pour caractériser un composé purifié selon l'invention, il suffit donc de :

- démontrer qu'il induit une activation des lymphocytes $T_{\gamma 962}$, par exemple par un test de 5 lymphoprolifération,

- démontrer que cette activité vis-à-vis des lymphocytes $T_{\gamma 962}$ disparaît soit en présence d'une monoester phosphorique phosphohydrolase (sa structure s'apparente donc à celle de TUBag1 ou de TUBag2), soit en 10 présence d'une part d'une monoester phosphorique phosphohydrolase et, d'autre part, d'une diester phosphorique phosphohydrolase et/ou d'une pyrophosphohydrolase (sa structure s'apparente donc à celle de TUBag3 ou de TUBag4).

15 Pour identifier précisément la nature du composé, il suffit en outre d'observer son ordre d'élution à la chromatographie HPLC de type C18 éluée en paire d'ions avec l'acétate d'ammonium 0,1 M en le comparant à ceux obtenus avec une solution contenant les composés selon 20 l'invention isolés à partir de l'extrait mycobactérien ME (figure 2), et de déterminer son temps de rétention en chromatographie HPAEC et le comparer au tableau I ci-dessus.

Par ailleurs, si on dispose d'une solution 25 hétérogène incorporant un composé selon l'invention, on peut caractériser la présence de ce composé organo-phosphoré antigénique en soumettant cette solution aux étapes de séparation chromatographique mentionnées ci-dessus pour l'extrait mycobactérien ME, notamment au moins une 30 séparation préparative des différents principes actifs de l'eluat par chromatographie HPLC sur phase inverse C18 éluée en paire d'ions et/ou par chromatographie échangeuse d'anions HPAEC avec détection conductimétrique opérant en mode de suppression chimique, chaque étape de séparation 35 étant suivie d'une mesure de l'activité des différentes fractions obtenues sur des lymphocytes $T_{\gamma 6}$.

CYTOTOXICITE DES LYMPHOCYTES $T_{\gamma\delta}$ EN PRESENCE DES COMPOSES ORGANO-PHOSPHORES ISOLES :

L'activité cytolytique d'un clone de lymphocytes $T_{\gamma 962}$ (G115) et d'un clone contrôle de lymphocyte T non $\gamma\delta$ (BH) contre des cellules cibles est mesurée en l'absence ou en présence du composé TUBag4.

Cette activité induite par TUBag4 est déterminée par la formule suivante : (% de lyse spécifique en présence de TUBag4) - (% de lyse spécifique sans TUBag4).

Cette cytotoxicité est estimée à un rapport de cellules tueuses sur cellules cibles de 20 pour 1.

Les résultats sont illustrés par le tableau IV suivant :

15

TABLEAU IV

CELLULES CIBLES			LYSE INDUIITE PAR TUBag4	
ORIGINE	NOM	NATURE	G115	BH
Humaine	DAB	BLCL	32	0
	BL70	B Lymphoma	21	0
	BL2195	B Lymphoma	37	3
	RJ225	B Lymphoma	25	0
	RAJI	B Lymphoma	32	0
	BL30195	B Lymphoma	20	0
	BL 30	B Lymphoma	34	5
	KGI	T Lymphoma	16	0
	THPI	T Lymphoma	12	0
	KE6TG	T Lymphoma	26	0
	HSB2	T Lymphoma	21	0
	MRC5	Fibroblast	39	0
Murine	DA2	Inconnue	14	6
	BW5147	Thymoma	12	0
	A20	B Lymphoma	22	0
	SP20	Myeloma	9	0
	P815	Mastocytoma	32	0

Comme on le voit, TUBag4 induit une lyse de toutes les cellules cibles par le clone G115 seulement, mais n'induit pas de lyse par le clone contrôle BH.

Cette activité lytique n'est pas spécifique de la cellule cible. Cette activité cytolytique n'est pas non plus restreinte par le complexe MHC. En particulier,

les composés antigéniques selon l'invention activent la cytotoxicité du lymphocyte $T_{\gamma\delta}$ G115 sur différentes cellules cancéreuses issues de donneurs différents humains ou de souris.

5 De plus, il a été démontré que les composés selon l'invention activent directement l'activité cytotoxique du lymphocyte $T_{\gamma\delta}$ G115 sans interférer avec la cellule cible.

10 Cette démonstration a été effectuée par des essais de pré-incubation dont les résultats indiquent que TUBag4 active directement le clone $T_{\gamma 962}$.

15 Cette interaction directe implique TUBag4 et le TCR $V_{\gamma 9} V_{\delta 2}$ comme l'indique l'inhibition totale de cette activité cytotoxique lorsque l'expérience est effectuée en présence d'anticorps monoclonaux dirigés contre le TCR $V_{\gamma 962}$ (figure 9). Par contre, les anticorps anti-TCR $V_{\delta 1}$, HLA DR, HLA DP/DR et HLA 1 n'inhibent pas cette activité cytotoxique. Cela confirme l'absence de restriction par le MHC de cette réponse lymphocytaire.

20 L'efficacité thérapeutique des composés et compositions selon l'invention n'est donc pas limitée par les caractéristiques tissulaires du patient traité, et ce contrairement à la plupart des vaccins connus.

25 L'invention permet ainsi de stimuler ou d'inhiber, c'est-à-dire de moduler, la prolifération et/ou la cytotoxicité des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$. A ce titre, on peut donc utiliser un composé organo-phosphoré tel que TUBag1, TUBag2, TUBag3, TUBag4, ou un composé incorporant ces composés organo-phosphorés ou un groupement similaire, pour 30 obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des maladies de l'homme ou de l'animal dans lesquelles les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ sont impliqués, notamment les maladies infectieuses (en particulier mycobactériennes telles que la lèpre ou la tuberculose) ; 35 les affections tumorales ou leucémiques de l'homme ou de l'animal ; les parasitoses ; les pathologies immuno-déficiences telles que le SIDA, ...

A l'inverse, on peut aussi inhiber

l'activité des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ in situ en utilisant une enzyme dégradant les antigènes formés des composés organo-phosphorés selon l'invention. Selon l'antigène concerné, on utilise une monoester phosphatase et/ou une diester phosphatase (y compris une pyrophosphatase telle qu'une nucléotide pyrophosphatase).

REVENDICATIONS

1/ - Composé organo-phosphoré hydrosoluble de nature non-peptidiq  e, activateur des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables 5 $V_{\gamma 9}$ et $V_{\delta 2}$, ce composé comprenant au moins une liaison ester acidolabile de l'acide phosphorique, le caractère activateur de ce composé vis-à-vis des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ disparaissant lorsqu'il est placé en présence d'un mélange enzymatique comprenant au moins une monoester phosphorique 10 phosphohydrolase et au moins une diester phosphorique phosphohydrolase.

2/ - Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente un caractère anionique mesuré par chromatographie HPAEC    détection 15 conductimétrique en mode de suppression chimique qui est supérieur à celu   de l'acide phosphonoformique et inférieur à celu   de la thymidine 5' triphosphate.

3/ - Composé selon l'une des revendications 1 et 2 caractérisé en ce que, après traitement par une 20 enzyme diester phosphorique phosphohydrolase, il présente un caractère anionique mesuré par chromatographie HPAEC    détection conductimétrique en mode de suppression chimique qui est supérieur à celu   de l'acide phosphonoformique et inférieur à celu   de la thymidine 5' triphosphate.

25 4/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il présente un caractère hydrophobe mesuré par chromatographie HPLC sur phase inverse de type C18 elu  e en paire d'ions avec l'acétate d'ammonium, inférieur à celu   de la thymidine 5' 30 monophosphate.

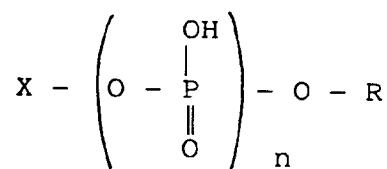
5/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que son effet d'activation sur les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ est inhibé en présence d'anticorps monoclonaux spécifiques de TCR humains comprenant les 35 régions variables $V_{\gamma 9}$ et $V_{\delta 2}$.

6/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un substituant X d'un atome de phosphore de masse moléculaire

inférieure à 500, qui est distinct d'un acide nucléique, d'un oligosaccharide, d'un acide gras, d'un protide, d'un alcaloïde et d'un stéroïde, et qui est lié dans le composé à un groupement phosphoryle par une liaison covalente 5 acidolabile susceptible d'être clivée en présence d'une monoester phosphatase.

7/ - Composé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il répond à la formule :

10



15 où :

R est un hydrogène ou un substituant minéral ou organique, n est un nombre entier non nul.

8/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un 20 groupement nucléosidique.

9/ - Composé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le groupement nucléosidique est la thymidine liée à un groupement phosphoryle par le cinquième carbone de son radical 2-désoxyribose.

10/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un produit de l'hydrolyse d'un composé selon la revendication 9 par l'action enzymatique d'une nucléotide pyrophosphatase et/ou d'une diester phosphorique 30 phosphohydrolase.

11/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un monoester phosphorique acidolabile de masse moléculaire inférieure à 500 distinct de la thymidine 5' 35 monophosphate, de la thymidine 5' diphosphate, de la thymidine 5' diphosphate glucose et de la thymidine 5' triphosphate.

12/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est 40 constitué d'un diester phosphorique acidolabile de masse

moléculaire inférieure à 1 000, distinct de la thymidine 5' monophosphate, de la thymidine 5' diphosphate, de la thymidine 5' diphosphate glucose et de la thymidine 5' triphosphate.

5 13/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 12 pour utilisation comme antigène des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains.

14/ - Procédé pour caractériser un antigène des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains caractérisé en ce que :

10 - l'on vérifie qu'il induit une activation des lymphocytes,

15 - l'on vérifie que cette propriété vis-à-vis des lymphocytes disparaît lorsqu'il est placé en présence d'un mélange enzymatique comprenant au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase et au moins une diester phosphorique phosphohydrolase.

16/ - Procédé pour préparer et/ou isoler et/ou caractériser au moins un composé organo-phosphoré selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'on soumet une solution aqueuse activant les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à au moins une étape de séparation par chromatographie préparative en différentes fractions, et en ce que l'on teste l'activité de chaque fraction sur des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains.

25 16/ - Procédé selon la revendication 15 pour isoler au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé par les étapes suivantes :

30 - on cultive une souche d'êtres vivants unicellulaires susceptible d'activer des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables $V_{\gamma 9} V_{\delta 2}$,

35 - on réalise un extrait brut de la souche ou on collecte son milieu de culture, dont on sépare les composants hydrosolubles,

- on sépare une solution aqueuse comprenant ces composants hydrosolubles par chromatographie préparative en différentes fractions susceptibles d'activer

les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables $V_{\gamma 9}$ $V_{\delta 2}$.

17/ - Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'on cultive une souche de mycobactéries, on effectue une extraction lipidique, et on sépare la phase aqueuse de l'extrait lipidique brut.

18/ - Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on cultive *Mycobacterium tuberculosis*.

19/ - Procédé selon l'une des revendications 15 et 16, caractérisé en ce qu'on cultive une souche de mycobactéries aptes à sécréter le (les) composé(s) dans le milieu de culture.

20/ - Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'on cultive *Mycobacterium fortuitum* 15 *biovar fortuitum*.

21/ - Procédé selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisé en ce que l'étape de séparation par chromatographie comprend une séparation anionique par chromatographie échangeuse d'anions avec une 20 solution saline dont on récupère l'éluat qui active les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$.

22/ - Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'on effectue ensuite une séparation de la solution saline qui active les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ suivie 25 d'un séchage.

23/ - Procédé selon l'une des revendications 15 à 22, caractérisé en ce que l'étape de séparation par chromatographie comprend au moins une séparation préparative des différents principes actifs de 30 l'éluat par chromatographie HPLC sur phase inverse C18 éluée en paire d'ions et/ou par chromatographie échangeuse d'anions HPAEC avec détection conductimétrique opérant en mode de suppression chimique, chaque étape de séparation étant suivie d'une mesure de l'activité des différentes 35 fractions obtenues sur des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$.

24/ - Composé activant les lymphocytes humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables V_{γ} et V_{δ} -notamment $V_{\gamma 9}$ et $V_{\delta 2}$ - caractérisé en ce qu'il est

obtenu par un procédé selon l'une des revendications 15 à 23.

25/ - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un composé organo-phosphoré selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24.

26/ - Composition vaccinante caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un antigène selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24.

27/ - Utilisation d'au moins un composé 10 selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24, pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des maladies infectieuses de l'homme ou de l'animal.

28/ - Utilisation d'au moins un composé 15 selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24 pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des maladies infectieuses mycobactériennes -notamment la lèpre ou la tuberculose- de l'homme ou de l'animal.

20 29/ - Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24 pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des affections tumorales ou leucémiques de l'homme ou de l'animal.

25 30/ - Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24 pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des parasitoses de l'homme ou de l'animal.

30 31/ - Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24 pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des pathologies d'immunodéficiences telles que le SIDA.

35 32/ - Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24 pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des maladies parasitaires, notamment du paludisme.

33/ - Composition thérapeutique caractérisée en ce qu'elle contient une proportion pharmaceutiquement acceptable d'au moins un principe présentant une activité enzymatique phosphatase susceptible de dégrader au moins un composé activant des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables $V_{\gamma 9}$ et $V_{\delta 2}$.

34/ - Composition selon la revendication 33, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase.

35/ - Composition selon l'une des revendications 33 et 34, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une nucléotide pyrophosphatase.

36/ - Composition selon l'une des revendications 33 à 35, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une diester phosphorique phosphohydrolase.

37/ - Composition selon l'une des revendications 33 à 36, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une enzyme phosphatase alcaline.

38/ - Composition selon l'une des revendications 25, 26 ou 33 à 37, caractérisée en ce qu'elle est formulée sous une forme galénique destinée à son administration par injection dans le sang circulant.

39/ - Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 33 à 38 pour obtenir un médicament inhibant la cytotoxicité des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$ impliqués dans au moins une pathologie auto-immune.

40/ - Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 33 à 38 pour obtenir un médicament destiné au traitement de la sclérose en plaques.

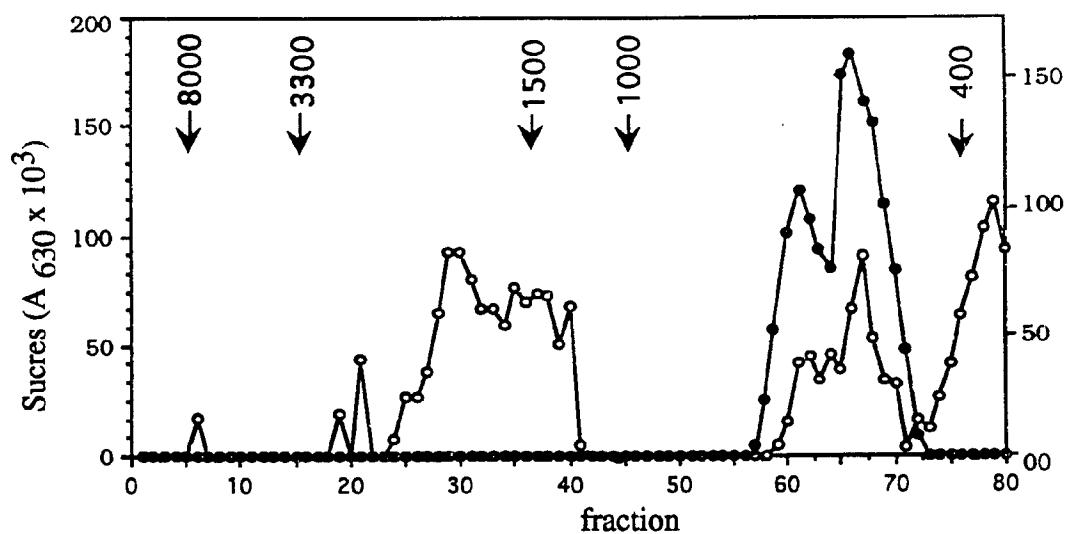


FIG.1

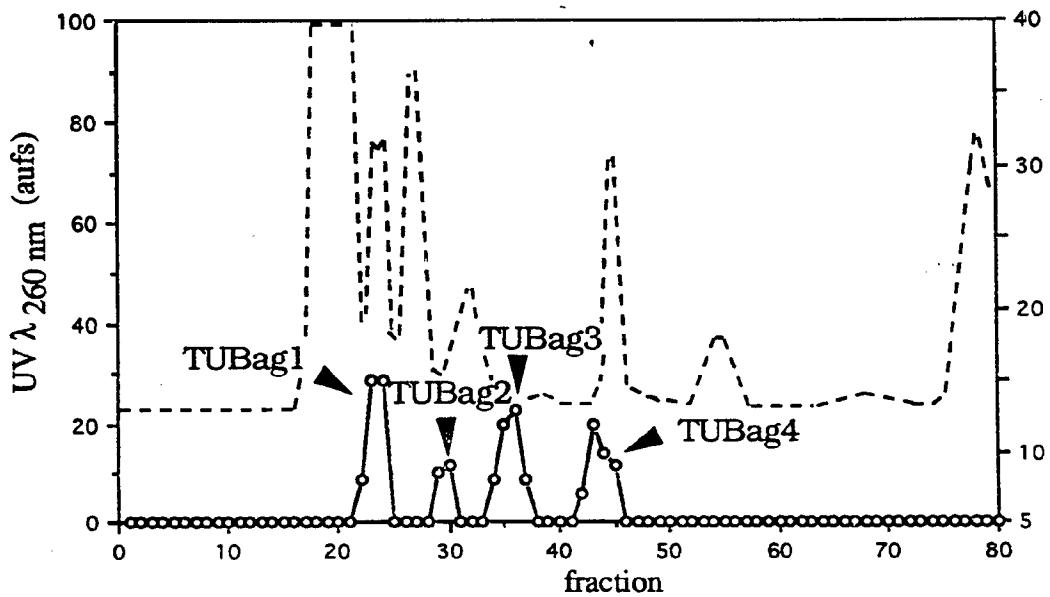


FIG.2

2/4

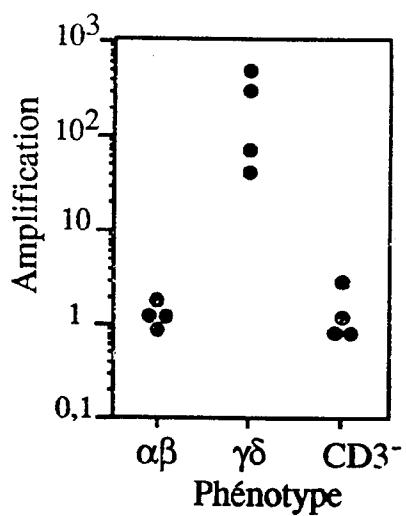
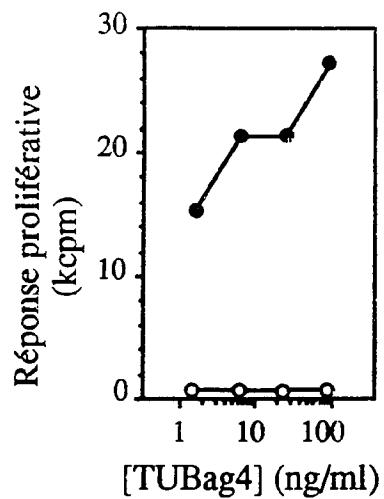
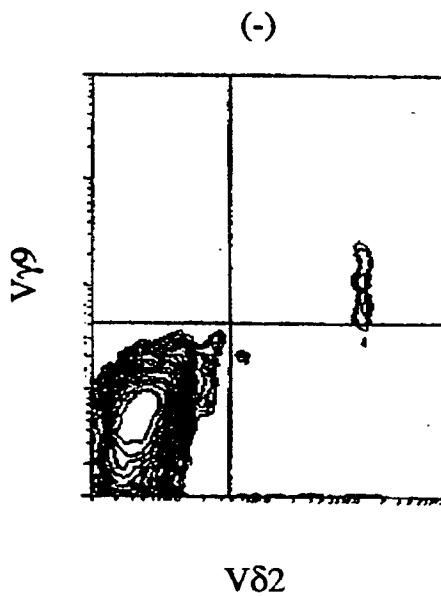
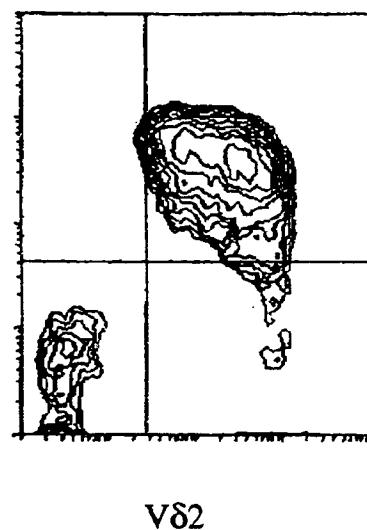
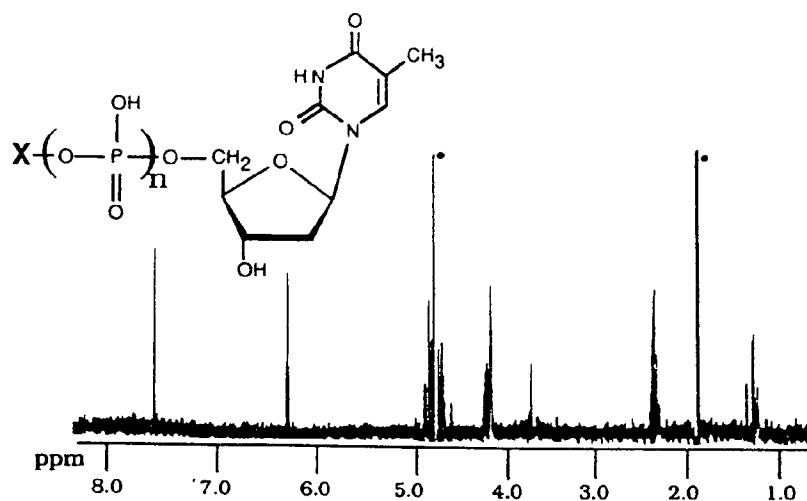
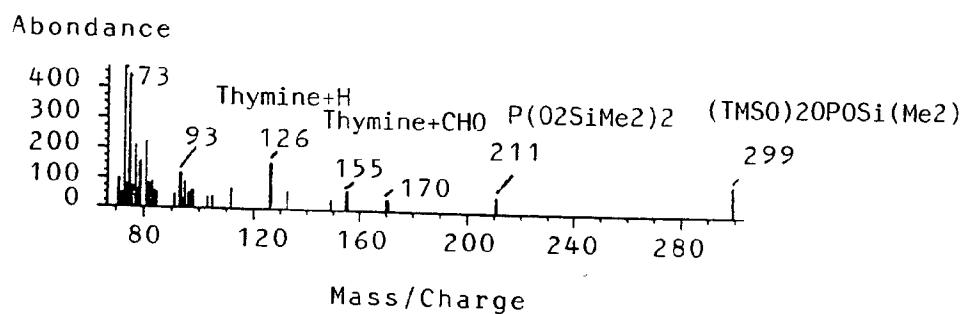
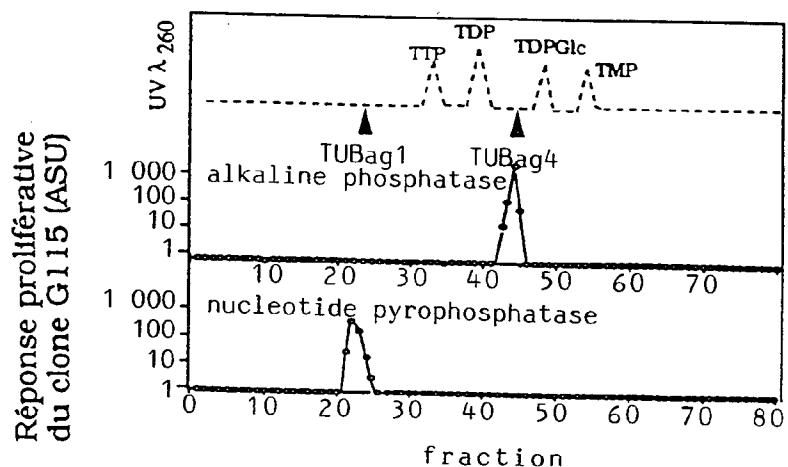
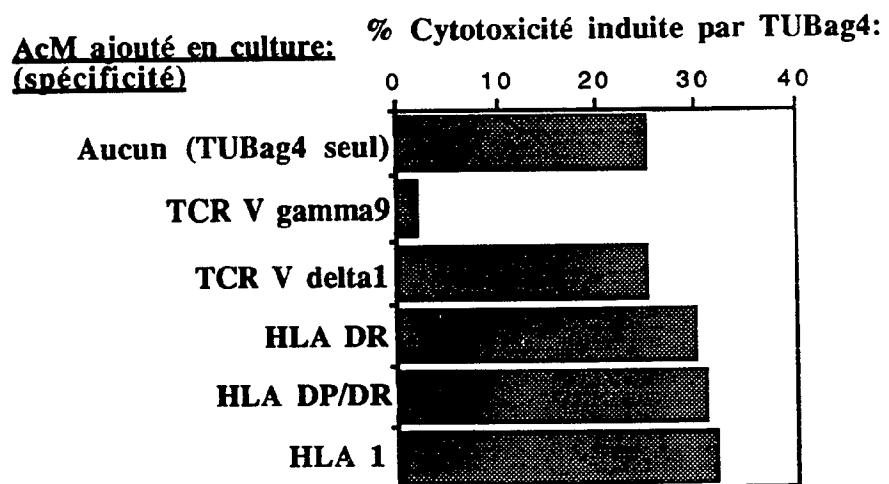
**FIG.3****FIG.5****FIG.4a****FIG.4b**

FIG.6**FIG.7****FIG.8**

FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

4 / 4

FIG.9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/FR 95/00092

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12P1/04 C07G17/00 A61K35/74 A61K39/04 A61K38/46
//(C12P1/04, C12R1:32)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C07G A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.151, no.3, 1 August 1993, BALTIMORE US pages 1214 - 1223</p> <p>F. DAVODEAU ET AL. 'CLOSE CORRELATION BETWEEN DAUDI AND MYCOBACTERIAL ANTIGEN RECOGNITION BY HUMAN GAMMA-DELTA T CELLS AND EXPRESSION OF V9JPC1-GAMMA/V2DJC-DELTA ENCODED T CELL RECEPTORS.'</p> <p>cited in the application see the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 April 1995	11.05.1995
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/FR 95/00092

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.148, no.2, 15 January 1992, BALTIMORE US pages 575 - 583 K. PFEFFER ET AL. 'A LECTIN-BINDING, PROTEASE-RESISTANT MYCOBACTERIAL LIGAND SPECIFICALLY ACTIVATES V-GAMMA 9+ HUMAN GAMMA-DELTA T CELLS.' see the whole document ---	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 19, 7 May 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 176581k, D. KABELITZ ET AL. 'A LARGE FRACTION OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD GAMMA/DELTA+ T CELLS IS ACTIVATED BY MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BUT NOT BY ITS 65-kD HEAT SHOCK PROTEIN.' page 542 ; see abstract & J. EXP. MED., vol.171, no.3, 1990 pages 667 - 679 ---	1
P, X	SCIENCE, vol.264, 8 April 1994, LANCASTER, PA US pages 267 - 270 P. CONSTANT ET AL. 'STIMULATION OF HUMAN GAMMA DELTA T CELLS BY NONPEPTIDIC MYCOBACTERIAL LIGANDS.' see the whole document -----	1-24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 95/00092

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12P1/04 C07G17/00 A61K35/74 A61K39/04 A61K38/46
//(C12P1/04, C12R1:32)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12P C07G A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche utilisés

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.151, no.3, 1 Août 1993, BALTIMORE US pages 1214 - 1223</p> <p>F. DAVODEAU ET AL. 'CLOSE CORRELATION BETWEEN DAUDI AND MYCOBACTERIAL ANTIGEN RECOGNITION BY HUMAN GAMMA-DELTA T CELLS AND EXPRESSION OF V9JPC1-GAMMA/V2DJC-DELTA ENCODED T CELL RECEPTORS.'</p> <p>cité dans la demande voir le document en entier ---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité où cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 Avril 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11.05.1995

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 95/00092

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.148, no.2, 15 Janvier 1992, BALTIMORE US pages 575 - 583 K. PFEFFER ET AL. 'A LECTIN-BINDING, PROTEASE-RESISTANT MYCOBACTERIAL LIGAND SPECIFICALLY ACTIVATES V-GAMMA 9+ HUMAN GAMMA-DELTA T CELLS.' voir le document en entier ---	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 19, 7 Mai 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 176581k, D. KABELITZ ET AL. 'A LARGE FRACTION OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD GAMMA/DELTA+ T CELLS IS ACTIVATED BY MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BUT NOT BY ITS 65-kD HEAT SHOCK PROTEIN.' page 542 ; voir abrégé & J. EXP. MED., vol.171, no.3, 1990 pages 667 - 679 ---	1
P, X	SCIENCE, vol.264, 8 Avril 1994, LANCASTER, PA US pages 267 - 270 P. CONSTANT ET AL. 'STIMULATION OF HUMAN GAMMA DELTA T CELLS BY NONPEPTIDIC MYCOBACTERIAL LIGANDS.' voir le document en entier -----	1-24